VisiGlo™ PLUS HRP Chemiluminescent Substarates 取扱説明書

VisiGlo™ PLUS HRP Substrates は、ルミノールをベースとした化学発光基質で、HRP 標識したレポーター分子を使用した実験系用にデザインされています。ブロッティング、マイクロウェルアッセイにおいて色素系基質より優れた感度を提供し、速やかな発光開始と低バックグラウンドを兼ね備えた検出を実現します。ブロッティングでは、X 線フィルムを使用しますと永久的にデータを残す事が出来ます。また、ブロッティングの stripping/reprobing も可能です。マイクロウェルアッセイでは、発光した状態がルミノメーターで赤色に観察されます。
VisiGlo PLUS™ HRP Substrates は、直線性のあるダイナミックレンジが他社の化学発光試薬よりも長時間にわたって得られます。

【内容】

・VisiGlo PLUS™ HRP Substrate A, 40mL
・VisiGlo PLUS™ HRP Substrate B, 80mL
(約 2,400cm^2 分のメンブレンの発色が可能です。)

【アプリケーション】

ELISA、ウェスタンブロッティング、サザンブロッティング、ドットブロッティング、プラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション

【保存・安定性について】

2～8℃保存で 1 年間、品質を保持します。

【使用前の準備】

・Substrate A : Substrate B = 1 : 2 の割合で混合します。
(メンブレン 10cm^2 に対し、混合液を 0.5mL 用意してください。)
・使用前に、混合液を室温に戻してください。
・混合液は、遮光する必要はありません。
・混合液は、室温で 1 時間、2～8℃で 24 時間品質を保持します。

【ブロッティングでのご使用】

特に注意書きが無い限り、全ての工程を室温で行ってください。
NOTE: 本製品は、ニトロセルロース、ナイロン、PVDF のいずれのメンブレンにも使用できます。
NOTE: ブロッキングには、スキムミルクかカゼインを含んだブロッキングバッファーの使用をお薦めします。BSA や血清を含んだブロッキングバッファーは、バックグラウンドを高くする原因になります。

ウェスタンブロッティング

1. 通常のプロトコールに従って、電気泳動とブロッティングを行います。
2. ブロッキングを行います。(室温で 1 時間、あるいは 2〜8℃で overnight)
3. ブロッキングバッファーで一次抗体または血清サンプルを希釈した液で、メンブレンをインキュベートします。(1 時間)
4. 洗浄バッファーでメンブレンを洗浄します。(5 分×3 回)
5. ブロッキングバッファーで HRP conjugate を希釈した液で、メンブレンをインキュベートします。(1 時間)
   HRP conjugate の最適濃度を知るには、条件検討を行う必要があります。
6. 4.と同様に、メンブレンを洗浄します。(5 分×3 回)
7. VisiGlo PLUS™ HRP Substrates の混合液を用意します(用量は"使用前の準備"の項をご参照ください)。混合液でメンブレンを 1 分間インキュベートします。
8. メンブレンをピンセットでつまみ、角をろ紙に当てて余分な VisiGlo PLUS™ HRP Substrates 混合液を除きます。メンブレンをハイブリダイゼーションバッグなどのプラスチックシートに挟みます。
   NOTE: 発光は 5 分以内で最高強度に達し、4〜8 時間持続します。
9. メンブレンを X 線フィルムに 1〜10 分間感光させるか、化学発光検出装置で観察します。最初に感光した時のシグナル強度から、最適な感光時間を決定することができます。

サザンブロッティング

1. 通常のプロトコールに従って、電気泳動とブロッティングを行います。
2. 適正な温度で、メンブレンをプレハイブリダイゼーションします。(30 分間〜1 時間)
3. ハイブリダイゼーションバッファーにビオチン化プローブを加え、適正な温度でハイブリダイゼーションします。(3〜16 時間)
4. SSC バッファー(アムレスコ型番 0804-4L)あるいは SSPE バッファー(アムレスコ品番 0810-4L)で、メンブレンをしっかり洗浄します。
5. メンブレンをブロッキングします。(30 分間〜1 時間)
6. ブロッキングバッファーで希釈した HRP-ストレプトアビジンでメンブレンをインキュベートします。(20〜30 分間)
   HRP-ストレプトアビジンの最適濃度を知るには、条件の検討を行う必要があります。
7. メンブレンを清潔な容器に移し、洗浄します。(5 分間×3 回)
8. VisiGlo PLUS™ HRP Substrates の混合液を用意します(用量は"使用前の準備"の項をご参照ください)。混合液でメンブレンを 1 分間インキュベートします。
9. メンブレンをピンセットでつまみ、角をろ紙に当てて余分な混合液を除きます。メンブレンをハイブリダイゼーションバッグなどのプラスチックシートに挟みます。
   NOTE: 発光は 5 分以内で最高強度に達し、4〜8 時間持続します。
10. メンブレンを X 線フィルムに感光させるか、化学発光検出装置で観察します。最初は、プラスミド DNA の場合 10〜15 分間、ゲノム DNA の場合 30〜60 分間の感光をお薦めします。最初に感光した時のシグナル強度から、最適な感光時間を決定することができます。

【トラブルシューティング】

1. シグナルまたはバックグラウンドが高すぎる。

・フィルムの感光時間を減らしてください。

・HRP conjugate の濃度を下げてください。

・conjugate のインキュベート時間を減らしてください。

・洗浄またはブロッキングの時間を増やしてください。

・電気泳動でロードするサンプル量を減らしてください。

2. シグナルが検出されない。

・ブロッティング後のゲルをクーマシーブルー(タンパク質の場合)か、エチジウムブロマイド(DNA の場合)で染色し、ブロッティングが確実に行われているか確認してください。

・タンパク質サンプルの場合、メンブレンをポンソーS かアミドブラックで染色し、ブロッティングが確実に行われているか確認してください。

・HRP 標識 2 次抗体が、1 次抗体へ特異的かどうか確認してください。

・使用するバッファー類にアジ化ナトリウムを加えないようご注意ください。アジ化ナトリウムは、ペルオキシダーゼ活性を阻害します。

3. シグナルが弱い。

・フィルムの感光時間を増やしてください。

・conjugate の濃度を増やしてください。

・conjugate のインキュベート時間を増やしてください。

・電気泳動でロードするサンプル量を増やしてください。

・1 次抗体が目的タンパク質へ高い親和性をもっているか確認してください。抗体の親和性は、SDS によるサンプルの変性の前後で変化することがあります。

株式会社エムエステクノシステムズ

●大阪　電話 06-6396-6616

●東京　電話 03-3235-0673